

ESTABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ENCAPSULADAS PELA TÉCNICA DE SECAGEM EM “SPRAY DRYER” DURANTE ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO

LINCOLN S. GONÇALVES¹, IZILDINHA MORENO², ALCINA M. LISERRE³,
CRISTIANO R. MENEZES⁴, ADRIANE E. C. ANTUNES⁵, LUCIANA R. MONTEIRO⁶,
JAQUELINE B. MENDONÇA⁶, NATÁLIA C. AZAMBUJA⁶

Nº 10234

RESUMO

As culturas probióticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* foram microencapsuladas em acetato ftalato celulose com Hi-maize e outros compostos pela técnica de secagem por atomização em *spray dryer*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade dos microrganismos probióticos microencapsulados durante o período de armazenamento, bem como verificar a sobrevivência das bactérias após passagem simulada pelo trato gastrointestinal humano. O suco gástrico foi simulado com solução pH 2,5, adicionada de pepsina (3g/L), e o suco entérico em soluções com pH 5,6 e 7,5, adicionadas de bile (3g/L), de acordo com as condições do sistema intestinal humano. Como resultados, obteve-se contagens acima de 9 e 8 ciclos logarítmicos de células por grama para *B. animalis* e *L. acidophilus*, respectivamente, após secagem a 110°C. Durante os 120 dias de estocagem, houve uma redução de aproximadamente um ciclo logarítmico nas contagens para os dois tipos de bactérias encapsuladas. Ao final dos testes de resistência aos sucos gástrico e entérico, as populações de *B. animalis* apresentaram sobrevivência de aproximadamente 8 ciclos logarítmicos após 120 dias de estocagem, enquanto as populações de *L. acidophilus* foram reduzidas ao limite de detecção do teste ($\leq 2,00$ Log UFC/g) após 60 dias de estocagem, demonstrando o quanto esta cepa foi sensível à ação dos sais biliares. Conclui-se o *B. animalis* é mais indicado para a aplicação em microcápsulas, em comparação à aplicação de *L. acidophilus*, devido à sua maior resistência à passagem simulada pelo trato gastrointestinal.

Palavras-chave: acetato ftalato celulose, microencapsulação, *spray dryer*, probióticos.

1. BOLSISTA CNPq: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, * lincoln@fea.unicamp.br
2. ORIENTADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP imoreno@ital.sp.gov.br
3. COLABORADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP
4. COLABORADOR: Pesquisador, UNC, Santa Maria-RS
5. COLABORADOR: Pesquisador, FCA/UNICAMP, Limeira-SP
6. COLABORADOR: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

ABSTRACT

Bifidobacterium animalis and *Lactobacillus acidophilus* were microencapsulated in cellulose acetate phthalate with Hi-maize and others compounds by *spray-drying* technique. The aim of this study was to evaluate the stability of microencapsulated probiotic microorganisms during the storage period, and to verify the survival of bacteria after passage by the simulated human gastrointestinal tract. The behavior of the microcapsules was assessed in gastric juice with pH 2.5, which was added pepsin (3g/L). The intestinal fluid was simulated at pH 5.6 and 7.5, with the addition of bile (3g/L), according to the conditions of the human intestinal tract. The number of cells released from the microparticles was higher than 9 and 8 logarithmic cycles per gram for *B. animalis* e *L. acidophilus*, respectively, after dehydration at 110°C. During the 120 days of storage, there was a reduction of approximately one log cycle for the two types of encapsulated bacteria. At the end of the tests for resistance to enteric and gastric juices, the populations of *B. animalis* showed survival of about 8 log cycles after 120 days of storage, whereas the populations of *L. acidophilus* were reduced to the detection limit of the test (≤ 2.00 log CFU/g) after 60 days storage, demonstrating how this strain was sensitive to the action of bile salts. *B. animalis* is more suitable for application in microcapsules than *L. acidophilus*, due to its higher resistance to simulated passage through the gastrointestinal tract.

Keywords: cellulose acetate phthalate, microencapsulation, *spray dryer*, probiotics.

INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos necessita de constante inovação tecnológica na elaboração de seus produtos. Isto deve-se às necessidades diferenciadas que os consumidores exigem atualmente, mediante a maior conscientização de que uma alimentação saudável previne uma série de doenças, mantendo a saúde, além de propiciar melhor desempenho físico e mental.

Os probióticos são atualmente definidos internacionalmente como microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; SANDERS, 2003).

O efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente, por isso essas bactérias devem ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo os processos fisiológicos e físico-químicos do trato gastrintestinal. Além de estar presente no produto em concentração significativa, para ação benéfica efetiva no intestino os probióticos devem ser capazes de sobreviver à alta acidez do estômago e

à presença de bile, para colonizá-lo e proliferar (TUOMOLA *et al.* 2001, BURITI *et al.* 2005).

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 2008) tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país. Atualmente, a recomendação é com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC.

Alimentos probióticos devem conter linhagens específicas de microrganismos probióticos e manter um nível apropriado de células viáveis durante a vida-de-prateleira do produto, sem interferir no sabor e textura, e preferencialmente, não se multiplicar (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

A técnica de secagem e microencapsulação por *spray dryer* é a mais utilizada atualmente, e além de produzir um produto de boa qualidade, é econômica e pode ser aplicada em grandes escalas na indústria de alimentos. O processo de secagem ocorre com a atomização do líquido, podendo ser uma solução, suspensão ou emulsão, em uma corrente de ar quente (JACKSON e LEE, 1993). Durante a evaporação do solvente, as gotículas atomizadas geram partículas sólidas que são geralmente separadas através de uma corrente gasosa em um ciclone ou filtro retentor conectado à saída do secador.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da estabilidade de microrganismos probióticos microencapsulados com acetato ftalato de celulose pela técnica de secagem em "spray dryer" durante o período de armazenamento, bem como verificar a sobrevivência destas bactérias microencapsuladas após passagem simulada pelo trato gastrointestinal humano durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o processo de microencapsulação, foram utilizadas as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, além dos seguintes materiais: acetato ftalato de celulose (CAP), maltodextrina, glicerol, *Hi-maize*, Tween 80, trealose e leite reconstituído. As culturas *B. animalis* e *L. acidophilus* foram reativadas com leite desnatado e caldo MRS, respectivamente, centrifugadas e lavadas em salina (0,85%) por duas vezes. As formulações com *B. animalis* e com *L. acidophilus* foram desidratadas a 110°C com uma temperatura de saída em torno de 70°C em aparelho de *Spray Dryer* modelo Buchi-290 com bico pulverizador de 1,5 milímetro de diâmetro e capacidade de evaporação de 1,0L/hora.

As micropartículas foram armazenadas em frascos de vidro, dentro de dessecadores, sob temperatura de refrigeração ($7\pm 2^{\circ}\text{C}$). Após 1, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem, alíquotas dessas micropartículas foram retiradas para a realização de contagem total e avaliação da sobrevivência após passagem simulada pelo trato gastrointestinal. As populações de *L. acidophilus* foram enumeradas em ágar MRS e de *B. animalis* em ágar MRS suplementado com cloreto de lítio (0,1%), propionato de sódio (0,3%) e L-cisteína (0,05%) pela técnica de semeadura em profundidade e incubação a 37°C em anaerobiose por 72 horas.

Para a contagem total, as partículas foram dissolvidas em tampão fosfato pH 7,5 durante 3 horas de agitação à 37°C .

A avaliação da resistência das microcápsulas probióticas em condições simuladas do ambiente gástrico e intestinal foi realizada com base nos procedimentos de Sallans *et al.* (1988), Ganzle *et al.* (1999), e Liserre *et al.* (2007). Amostras das microcápsulas foram adicionadas à solução ácida pH 2,5, contendo pepsina (3g/L), e incubadas a 37°C em shaker por 120 min com agitação de 150 rpm. Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos também adicionou-se bile (Oxgall, Oxoid) na proporção adequada para uma concentração final de 3g/L. O experimento totalizou 6 horas de ensaio (120 min para cada pH), e para a contagem de bactérias probióticas, foram retiradas alíquotas em intervalos pré-definidos de 120 min para pH 2,5, 5,6 e 7,5. Para cada tratamento foram realizadas três repetições. Nesse experimento preparou-se duas soluções com pH 12,0 e 1,5, empregando-se soluções de HCl 1N, NaOH 1N, e os sais NaCl e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A mistura dessas soluções na proporção adequada resultou nos valores de pH 2,5, 5,6 e 7,5 (SALLANS *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA Copyright @ 1999-2001, Release 8.12, TS2MO).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a metodologia de formação de partículas por secagem em *spray dryer* é tecnologicamente viável para a produção de micropartículas caracterizadas como matrizes poliméricas com microrganismos imobilizados.

As populações de microrganismos encapsulados com 1, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem podem ser observadas na tabela 1. Para *L. acidophilus*, observa-se pela tabela 1 que a população inicial de 8,6 log UFC/g foi reduzida para 8,21, 8,34, 7,57 e 7,62 log UFC/g após 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem, respectivamente, com

diferença significativa após o primeiro e o terceiro mês. Para *B. animalis* nota-se que a população oscilou entre 8,36 e 9,75 log UFC/g durante os 120 dias de estocagem, com uma queda de aproximadamente um ciclo logarítmico após o primeiro mês de armazenamento, a qual foi significativamente diferente.

Como o objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade de microrganismos probióticos encapsulados ao longo do período de estocagem, nota-se que, apesar da redução na população de células viáveis, ainda obteve-se contagens entre 8 e 9 log UFC/g para o microrganismo *B. animalis*, o que não ocorreu com *L. acidophilus*, cujas populações foram inferiores a 8 log UFC/g após 3 meses de estocagem.

Outros pesquisadores obtiveram resultados similares como Sunny-Roberts e Knorr (2009), embora com outras bactérias probióticas. Eles avaliaram a secagem em *spray dryer* de células de *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 com a adição de trealose, bem como a estabilidade destas partículas durante 6 semanas de armazenamento a 25°C. Segundo estes pesquisadores, as populações de lactobacilos permaneceram constantes a um nível de 10⁸ UFC/g durante todo o período de armazenamento.

Tabela 1. Populações médias (log UFC/g) de *B. animalis* e *L. acidophilus* em partículas após o processamento e com 1, 30, 60, 90 e 120 meses de estocagem.

Tempo (dias)	<i>B. animalis</i> *	DP**	<i>L. acidophilus</i> *	DP
1	9,75 ^A	0,07	8,60 ^A	0,05
30	8,42 ^B	0,15	8,21 ^B	0,47
60	8,36 ^B	0,05	8,34 ^{AB}	0,12
90	8,95 ^{AB}	0,04	7,57 ^C	0,08
120	8,66 ^B	0,10	7,62 ^C	0,13

* Letras maiúsculas indicam que os resultados diferem significativamente nos diferentes tempos de estocagem para cada microrganismo ($P \leq 0,05$). ** DP = Desvio Padrão

Os resultados obtidos após a realização de testes de simulação do trato gastrointestinal humano com soluções pH 2,5, 5,6 e 7,5, durante o período de estocagem, estão relatados na tabela 2 e na figura 1. Com relação à sobrevivência após simulação do trato gastrointestinal, nota-se que as populações de lactobacilos foram reduzidas drasticamente, principalmente após as etapas de fluidos entéricos com adição de sais de bile (pH 5,6 e 7,5), situação em que houve uma redução na população de lactobacilos para 3,71 log UFC/g após 30 dias de estocagem. A partir de 60 dias de estocagem, este microrganismo não foi mais detectado dentro dos limites de detecção do teste ($\leq 2,00$ log UFC/g) após as simulações de fluidos gástricos e entéricos. Observa-se também que a diferença entre a população total (Tabela 1) e a

população após passagem pelo suco gástrico (pH 2,5 – Tabela 2) foi inferior a 0,6 ciclos logarítmicos. Esses resultados demonstram que este microrganismo possui resistência à solução ácida, mas alta sensibilidade à presença de sais de bile.

As células encapsuladas de *B. animalis*, por sua vez, foram extremamente resistentes às soluções ácidas e aos sais de bile, visto que com até 90 dias de estocagem, as contagens após a realização dos testes de simulação de sucos gástrico e entérico mantiveram-se acima de 8 log UFC/g. Todavia, com 120 dias de estocagem a contagem das células após a realização destes testes reduziu para 7,8 log UFC/g. Observa-se também que durante a transição entre suco gástrico (pH 2,5) e sucos entéricos (pH 5,6 e 7,5) a redução na população de bifidobactérias foi inferior a 0,5 ciclo logarítmico, o que demonstra a alta resistência dessas bactérias aos sais de bile, uma vez que estas células já estavam injuriadas devido à secagem no *spray dryer* e à passagem pela solução pH 2,5 com 0,3% pepsina.

Tabela 2. Populações médias (log UFC/g) de *L. acidophilus* e *B. animalis* após simulação do trato gastrintestinal com pH 2,5, 5,6 e 7,5, após 1, 30, 60, 90 e 120 dias.

<i>L. acidophilus</i> (log UFC/mL)*						
Tempo (dias)	pH 2,5		pH 5,6		pH 7,5	
1 dia	7,00 ^{A,a}	± 0,05	6,89 ^{A,a}	± 0,29	6,46 ^{A,b}	± 0,45
30 dias	6,95 ^{A,a}	± 0,04	4,70 ^{B,b}	± 0,06	3,71 ^{B,c}	± 0,28
60 dias	6,15 ^{B,a}	± 0,22	≤2,00 ^{C,b}	---	≤2,00 ^{C,b}	---
90 dias	6,27 ^{B,a}	± 0,25	≤2,00 ^{C,b}	---	≤2,00 ^{C,b}	---
120 dias	6,47 ^{B,a}	± 0,11	≤2,00 ^{C,b}	---	≤2,00 ^{C,b}	---
<i>B. animalis</i> (log UFC/mL)*						
1 dia	9,44 ^{A,a}	±0,06	9,13 ^{A,b}	±0,10	9,27 ^{A,ab}	±0,07
30 dias	9,03 ^{B,a}	±0,18	8,71 ^{B,b}	±0,20	8,83 ^{B,ab}	±0,21
60 dias	8,89 ^{B,a}	±0,20	8,34 ^{C,b}	±0,17	8,85 ^{B,a}	±0,05
90 dias	9,29 ^{A,ab}	±0,05	9,06 ^{A,b}	±0,10	9,36 ^{A,a}	±0,05
120 dias	8,18 ^{C,a}	±0,11	7,70 ^{D,b}	±0,20	7,97 ^{C,a}	±0,36

* Para cada linha letras maiúsculas indicam que os resultados diferem significativamente entre si (P≤0,05). Para cada coluna letras minúsculas indicam que os resultados diferem estatisticamente entre si (P≤0,05).

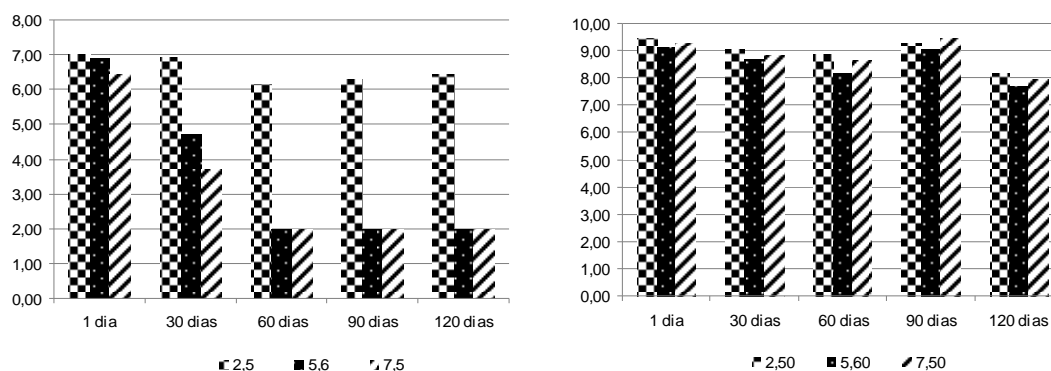


Figura 1. Populações médias (log UFC/g) de *L. acidophilus* e *B. animalis*, respectivamente, após simulação do trato gastrointestinal com pH 2,5, 5,6 e 7,5, após 1, 30, 60, 90 e 120 dias.

Em outros trabalhos verificou-se uma maior perda de células viáveis para bifidobactérias. Liserre *et al.* (2007), por exemplo, encapsularam *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 em alginato-quitosana-acryl-eze e após realização de testes em sucos gástrico e entéricos simulados obtiveram redução de 2,43 ciclos logarítmicos na contagem total das partículas. Annana *et al.* (2008) encapsularam *Bifidobacterium adolescentis* 15703T em partículas de gelatina revestidas com alginato de cálcio e avaliaram a resistência deste microrganismo à passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Após a incubação em suco gástrico simulado (pH 2,0, 1 h) e sucos intestinais simulados (pH 7,4, 4 h) o número de células sobreviventes foi de 7,6 e 6,4 log UFC/mL, respectivamente.

CONCLUSÃO

- Conclui-se que a secagem por *spray dryer* é uma técnica eficiente para a formulação de partículas a base de acetato ftalato celulose e adicionadas de bifidobactérias.
- Durante os 120 dias de estocagem, houve uma redução de aproximadamente um ciclo logarítmico nas contagens para os dois tipos de bactérias encapsuladas, o que demonstra a estabilidade destas cepas durante o armazenamento.
- Todavia, após os testes de simulação dos sucos gástrico e entérico, as populações de *L. acidophilus* foram reduzidas ao limite de detecção do teste ($\leq 2,00$ Log UFC/g) após 60 dias de estocagem, demonstrando o quanto esta cepa foi sensível à ação dos sais biliares.
- Por outro lado, as populações de *B. animalis* apresentaram sobrevivência de aproximadamente 8 ciclos logarítmicos após passagem simulada pelo trato

gastrointestinal durante os 120 dias de estocagem, com reduções máximas de até 0,7 ciclos logarítmicos.

- Conclui-se o *B. animalis* é mais indicado para a aplicação em microcápsulas, em comparação à aplicação de *L. acidophilus*, devido à sua maior resistência à passagem simulada pelo trato gastrointestinal. Vale salientar que essa comprovação é obrigatória pela legislação brasileira para a obtenção de registro de produtos probióticos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNANA, N.T.; BORZAA, A.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, v.41, n.2, p184-193, 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. VIII - Lista das Alegações Aprovadas. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em 15 mai. 2009.

BURITI, F.C.A., ROCHA, J.S. da, SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas frescal cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, p.1279-1288, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2010. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v.56, p. 259-63, 1993.

LISERRE, A.M.; FRANCO, B.D.G.M; RÉ, M.I. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, v. 21, p. 1-16, 2007.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J., Amsterdam*, v.12, p.173-182, 2002.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, v.61, p.91-99, 2003.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal*, v.19, p.209–214, 2009.

TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.73, p. 393S-398S, 2001.